



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA DURSKI

**MÉTODOS DE MICROSCOPIA PARA DIAGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES DE
MICROBIOTA VAGINAL**

CURITIBA

2017

MARIANA DURSKI

**MÉTODOS DE MICROSCOPIA PARA DIAGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES DE
MICROBIOTA VAGINAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à banca avaliadora como
requisito parcial para a conclusão do curso
de Biomedicina, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Camila Marconi

CURITIBA

2017

Dedico este trabalho à Luiza Almeida Kato

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde e força para a realização deste trabalho.

Aos meus pais e avós, pelo incentivo e apoio.

Ao meu companheiro e aos amigos, por me darem forças nos momentos difíceis.

À minha orientadora, que dedicou um pouco do seu tempo a mim e sempre esteve presente.

“Quando a vida nos deixa cegos,
o amor nos mantêm gentis.”

Linkin Park

RESUMO

Alterações na microbiota vaginal estão associadas a diversas complicações ginecológicas e obstétricas. Diante disso, as características do ambiente vaginal e os métodos para sua avaliação têm sido objeto de estudo de diversos pesquisadores. O tipo de alteração mais comum da microbiota vaginal é a vaginose bacteriana (VB). Essa alteração está associada ao aumento do risco de aquisição de infecções sexualmente transmissíveis (IST) e a sérias implicações obstétricas, como a prematuridade. Alguns métodos de microscopia para classificação da microbiota, utilizando esfregaços da parede vaginal, foram propostos por pesquisadores como Spiegel et al. (1983). Tais autores classificaram a microbiota vaginal como normal quando há predominância de lactobacilos, ou como VB quando essas espécies estão diminuídas ou ausentes. Entretanto, atualmente considera-se como padrão-ouro para classificação da microbiota vaginal o método proposto por Nugent et al. (1991). Tal método prevê a classificação da microbiota em três categorias, normal, intermediária e VB, com base na semiquantificação dos morfotipos bacterianos e seus respectivos padrões de coloração após a técnica de Gram. Já em 2002, Ison & Ray incluíram duas classes àquelas já propostas por Nugent: classe 0 para a ausência de bactérias e classe IV quando observadas apenas células epiteliais cobertas apenas por cocos Gram-positivos. Também em 2002, Donders et al. (2002) descreveram um novo tipo de alteração de microbiota da vaginal denominada vaginite aeróbia (VA). Assim como a VB, a VA também é associada a diversas complicações obstétricas como parto prematuro, corioamnionite e funisite. Esta alteração de microbiota é acompanhada pelo aumento de leucócitos, presença de células epiteliais da camada parabasal e a presença de uma microbiota predominantemente aeróbia. Outros métodos importantes, porém menos utilizados, de classificação da microbiota foram desenvolvidos por Platz-Christensen et al. (1989), Thomason et al. (1992) e Schmidt & Hansen (2000). Todos os sistemas de classificação propostos tiveram como objetivo a padronização de um método de análise de esfregaços vaginais que seja reprodutível, abrangente quanto aos morfotipos bacterianos avaliados, ao mesmo tempo em que sejam compatíveis à utilização na prática clínica. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi comparar os métodos microscópicos de classificação de microbiota vaginal descritos na literatura quanto às variáveis consideradas para classificação da microbiota, os tipos de microbiota, a aplicabilidade na rotina clínica.

Palavras-chave: Microbiota vaginal. Lactobacilos. Vaginose bacteriana. Vaginite aeróbia.

ABSTRACT

Abnormal vaginal flora is associated with poor gynecological and obstetric outcomes. Thus, the aspects of the vaginal microbiota and the methods available for assessment have been object of study of several researchers. The most common type of abnormal vaginal microbiota is bacterial vaginosis (BV). This abnormal microbiota is associated with increased risk for sexually transmitted infections (STI) and deleterious effects in pregnancy, such as prematurity. Methods for classification of vaginal microbiota using microscopy of vaginal smears were described by several researchers as Spiegel et al. (1983). These authors consider normal microbiota when lactobacillus species are predominant, while they consider BV when such species are partially or totally depleted. However, it is currently accepted that the gold-standard for assessing the vaginal microbiota is the method developed by Nugent et al. (1991). This method includes the classification of microbiota in three categories: normal, intermediate and BV, based in their semiquantification and Gram-stain color pattern. In 2002, Ison & Ray included two other categories on the top of those of Nugent. They considered as vaginal microbiota class 0 when no bacteria were present and class IV when only epithelial cells and Gram-positive cocci were observed. Also in 2002, Donders et al. (2002) described a novel type of abnormal vaginal flora so called aerobic vaginitis (AV). Like BV, AV is associated with poor pregnancy outcomes as preterm labor, chorioamnionitis and funisitis. This abnormal vaginal flora is characterized by an increase in leucocytes number, atrophic epithelial cells and aerobic bacterial species. Other important methods, but less frequently used, were developed by Platz-Christensen et al. (1989), Thomason et al. (1992) e Schmidt & Hansen (2000). All systems proposed aimed to standardize reproductive methods of evaluation of vaginal microbiota that also could be implemented in clinical practice. Thus, the objective of this study was to compare the microscopic methods for accessing the vaginal microbiota available in the literature regarding the variables evaluated for classification, types of microbiota and applicability in the clinical practice.

Key words: Vaginal microbiota. Lactobacilli. Bacterial vaginosis. Aerobic vaginitis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	9
2.1	OBJETIVO GERAL	9
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3	MATERIAIS E MÉTODOS	10
4	DESENVOLVIMENTO	10
4.1	OS LACTOBACILOS	10
4.2	ALTERAÇÕES DE MICROBIOTA VAGINAL	11
4.3	TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	14
5	RESULTADOS E CONCLUSÕES	25
6	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

O ambiente vaginal é um local complexo composto de várias espécies de micro-organismos. Distúrbios na composição deste ambiente estão associados a diversas implicações negativas para a saúde reprodutiva feminina. Por este motivo, as características microbiológicas do ambiente vaginal têm sido objeto de inúmeros estudos ao longo dos anos. Albert Doderlein, em 1892, relatou pela primeira vez que no conteúdo vaginal de mulheres saudáveis há a presença de lactobacilos, e, mulheres que apresentam a ausência dessas espécies na microbiota local desenvolveram endometrite pós-parto (DODERLEIN, 1892). A descrição de Doderlein (1892) foi um pontapé inicial para que outros estudos surgissem com o objetivo de compreender a composição bacteriana do ambiente vaginal. Diversos estudos demonstraram que alterações na microbiota vaginal estão associadas a diversas complicações obstétricas e perinatais (HOLST et al., 1994; ESCHENBACH et al., 1984; MC DONALD et al., 1992; LEITCH et al., 2003).

Com o objetivo de classificar a microbiota vaginal, alguns critérios de avaliação microscópica foram desenvolvidos. Dentre eles, aqueles divulgados mundialmente foram propostos por Spiegel et al. (1983), Platz-Christensen et al. (1989), Nugent et al. (1991), Thomason et al. (1992), Schmidt e Hansen (2000), Ison & Hay (2002) e Donders et al. (2002). Todos esses métodos se baseiam na análise, por microscopia, de esfregaços contendo o material coletado da parede vaginal, observação dos morfotipos bacterianos presentes e na proporção de lactobacilos em relação aos demais morfotipos observados.

Apesar das classificações microscópicas serem muito importantes para a detecção de alterações de microbiota vaginal, elas não permitem a identificação exata das espécies bacterianas presentes, visto que se baseiam apenas na análise morfológica das bactérias presentes nos esfregaços. Nesse sentido, apenas os estudos recentes utilizando técnicas de biologia molecular permitiram o melhor entendimento dessa microbiota, como aquele realizado por Jacques Ravel e colaboradores, em 2011,

que caracterizou o microbioma vaginal de mulheres em idade reprodutiva. Ainda que os métodos moleculares tenham se mostrado excelente recurso para a classificação da microbiota vaginal, eles apresentam um longo tempo para execução e custo muito elevados quando comparados aos métodos microscópicos, sendo assim inviáveis à aplicação na prática clínica.

Nesse sentido, este estudo tem como objetivo a comparação entre as diferentes técnicas para classificação microscópica da microbiota vaginal visando identificar um método de fácil e rápida realização, mas que permita uma identificação completa dos tipos de alterações da microbiota vaginal potencialmente presentes. Dessa forma, os achados acerca das discussões nesse trabalho poderão nortear a implementação da análise microscópica de esfregaços vaginais na rotina clínica dos serviços de ginecologia e obstetrícia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é comparar as diferentes metodologias utilizadas para a detecção das alterações de microbiota vaginal, bem como suas vantagens e desvantagens de execução.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as metodologias de classificação microscópica da microbiota vaginal;
- Detalhar as metodologias de classificação mais utilizadas;
- Discutir as vantagens e desvantagens dos principais métodos utilizados;
- Eleger o(s) método(s) que permita(m) a identificação mais completa da microbiota vaginal e que seja aplicável à rotina dos serviços de saúde.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo consistiu em pesquisas bibliográficas para obtenção de informações acerca dos diferentes métodos de microscopia para classificação da microbiota vaginal. Para tal fim, foram utilizados os trabalhos científicos publicados em diversos anos. Tais trabalhos foram acessados utilizando os banco de dados SciELO e PubMed. As palavras-chave empregadas foram: Microbiota vaginal. Lactobacilos. Vaginite aeróbia. Vaginose bacteriana. Vaginal microbiota. Lactobacilli. Aerobic vaginitis. Bacterial vaginosis.

Foram extraídas dos trabalhos incluídos no estudo as informações relativas aos seguintes tópicos: saúde reprodutiva feminina, complicações ginecológicas e gestacionais, alterações de microbiota vaginal, vaginose bacteriana, vaginite aeróbia, métodos microscópicos de avaliação de microbiota vaginal e as vantagens e desvantagens dos métodos propostos na literatura. Foram considerados trabalhos publicados entre 1983 e 2002, somando 7 metodologias de microscopia de avaliação da microbiota vaginal.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 OS LACTOBACILOS

Albert Doderlein foi o primeiro pesquisador a demonstrar, em 1892, a presença de espécies de lactobacilos na microbiota vaginal de mulheres saudáveis. Além disso, ele demonstrou que aquelas nas quais as microbiotas careciam de lactobacilos desenvolveram endometrite pós-parto (DODERLEIN, 1892). Dessa forma, foi demonstrado pela primeira vez que um distúrbio na proporção lactobacilar no conteúdo vaginal pode levar a alterações na microbiota saudável e, conseqüentemente, a complicações ginecológicas e obstétricas. Assim, a definição de uma microbiota vaginal normal é aquela na qual é verificado o predomínio de morfotipos compatíveis com lactobacilos em comparação às demais bactérias. (DONDERS et al., 2000; SCHWEBKE et al., 2013).

Diversas espécies de lactobacilos que colonizam o corpo humano já foram descritas, e segundo Pavlova e colaboradores (2001), essas espécies podem ser encontradas em três regiões do corpo: a cavidade oral, os intestinos e o trato vaginal. As principais espécies que colonizam o ambiente vaginal descritas são *Lactobacillus iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. vaginalis*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus* (PAVLOVA et al., 2001; MARTIN et al. 1999; CRIBBY et al, 2008). De acordo com estudos de Song e colaboradores (1999) e de Ravel e colaboradores (2011), as espécies *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii* são as mais comumente identificadas na microbiota vaginal de mulheres em idade reprodutiva. No entanto, a prevalência das espécies varia de acordo com a origem geográfica da população, bem como a etnia.

A colonização do ambiente pelos lactobacilos ocorre após a primeira menstruação, quando os níveis de estrogênio aumentam deixando o ambiente vaginal mais favorável a sua colonização (PETROVA et al, 2013). O estrogênio estimula o aumento do glicogênio das células epiteliais vaginais (BOSKEY et al., 1999) que é metabolizado pelos lactobacilos liberando ácido láctico que diminui o pH vaginal (BOSKEY et al., 2001) deixando, assim, o ambiente menos favorável ao crescimento de outras bactérias anaeróbias que também podem ser encontradas colonizando este local (SRINIVASAN et al., 2010; XARRIFARD et al., 2002).

Mclean & Rosenstein (2000) e Eschenbach e colaboradores (1989) descreveram que várias espécies de lactobacilos exercem uma importante atividade antimicrobiana, visto que produzem e liberam, além do ácido láctico, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e bacteriocinas no ambiente vaginal. Dessa forma, os lactobacilos controlam com sucesso o crescimento de outras espécies no ambiente vaginal. Entretanto, Donders descreveu em 1999 que o excesso de produção de ácido láctico leva a uma queda grande no pH vaginal e pode culminar com a lise de células epiteliais. Essa citólise,

quando em grandes proporções, podem causar incômodos vaginais como queimação e prurido, embora seja uma condição bastante rara.

4.2 ALTERAÇÕES DE MICROBIOTA VAGINAL

Devido ao papel protetor dos lactobacilos, pode-se inferir que a depleção total ou parcial dos lactobacilos que ocorre simultaneamente à sua substituição por outras espécies bacterianas, sendo principalmente espécies anaeróbias (SOBEL, 1989). Estas alterações de microbiota tem diversas implicações negativas para a saúde reprodutiva feminina (KOVACHEV, 2014). Os distúrbios ginecológicos relacionados às alterações na microbiota vaginal incluem infecções pós-cirúrgicas (GUASCHINO et al., 2002), doença inflamatória pélvica (SWEET, 2000) e aumento do risco de aquisição de Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) como herpes genital (CHERPES et al., 2003), tricomoníase (BROTMAN et al., 2013), endocervicites por *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* (WIESENFELD et al., 2003) e infecções por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (SEWANKAMBO et al., 1997, SCHWEBKE, 2001). Quanto às complicações obstétricas associadas às alterações de microbiota, destacam-se o risco aumentado de aborto espontâneo, parto prematuro, corioamnionite e baixo peso ao nascimento (DONDERS et al., 2000; GOLDENBERG et al., 2000; PLATZ-CHRISTENSEN et al., 1993; LEITCH et al., 2003).

Enquanto a microbiota normal é caracterizada pela predominância de espécies de lactobacilos, a composição bacteriana da microbiota vaginal alterada é bastante heterogênea. Em 1955, Gardner & Dukes descreveram pela primeira vez uma alteração de microbiota vaginal e a denominaram "vaginite não específica". A etiologia dessa condição foi atribuída pelos autores à espécie *Haemophilus vaginalis*, a espécie bacteriana isolada das mulheres com os sintomas de mau odor vaginal característicos da vaginite. Esta espécie bacteriana, anteriormente incluída no gênero *Haemophilus*, foi reclassificada como *Gardnerella vaginalis*, denominação aceita até hoje (GREENWOOD & PICKETT, 1980). De fato, a *G. vaginalis* foi apontada por algum tempo como o único agente etiológico da vaginite não específica. Posteriormente foi intitulada como

vaginose bacteriana (VB) em razão da ausência de resposta inflamatória local na maioria dos casos (SPIEGEL et al., 1983).

A VB é a alteração mais comum de microbiota vaginal, com prevalência de 30% na população de mulheres em idade reprodutiva (MARCONI et al., 2015). Sua frequência também difere de acordo com a etnia, tendo maior prevalência na população afro-descendente (KOUMANS et al., 2007). Ela se caracteriza pela diminuição significativa ou até mesmo depleção dos *Lactobacillus* sp. e substituição por outras espécies bacterianas anaeróbias. Essa condição é relacionada ao aumento do risco de aquisição de IST, como *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis*, além do HIV (BROTMAN et al., 2013; WIESENFELD et al., 2003; SEWANKAMBO et al., 1997, SCHWEBKE, 2001). As mudanças dos níveis de mediadores locais da imunidade em resposta à alteração da microbiota também são apontados como centrais nos mecanismos que tornam as mulheres com VB mais propensas à aquisição dessas IST (WIGGINS et al., 2001).

Os sintomas da VB incluem o aumento do conteúdo vaginal, prurido e, o mais comum deles, o mau odor vaginal após adição de hidróxido de potássio (KOH) (AMSEL et al., 1983). No entanto, essas queixas são relatadas por apenas 50,0% das mulheres com VB, dificultando o diagnóstico desta alteração de microbiota (KOUMANS et al., 2007). Desse modo, grande parte das mulheres em idade reprodutiva não é diagnosticada e permanece com a VB por longos períodos de tempo e, portanto, mais suscetíveis às complicações relacionadas a essa condição.

Embora a composição bacteriana de mulheres com microbiota vaginal alterada já tenha sido descrita em um estudo de microbioma de mulheres em idade reprodutiva por Ravel e colaboradores (2011), ainda muito se discute sobre a causa dessa condição. Já foi demonstrado que a *G. vaginalis* é a bactéria mais comum a ser encontrada tanto de mulheres sintomáticas quanto mulheres assintomáticas com microbiota anormal (FREDRICSSON et al., 1984). Porém, um estudo realizado em por Criswell e colaboradores em 1969 demonstrou que a inoculação de *G. vaginalis* obtida a partir de

culturas puras em mulheres saudáveis não teve o efeito de causar alteração da microbiota na maior parte das mulheres testadas, enquanto que a inoculação do conteúdo vaginal de mulheres com VB no canal vaginal de mulheres com microbiota normal fez com que a maioria destas também desenvolvessem tal condição. Estes achados apontam para a grande complexidade microbiológica da VB, o que dificulta a determinação da sua etiologia. Estudos realizados por Hillier e colaboradores (1993), Rosenstein (1998) e Spiegel e colaboradores (1980) constataram variados gêneros de bactérias em culturas do material vaginal, como *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* sp., *Bacteroides fragilis*, *Prevotella* sp., *Mycoplasma hominis*, *Peptoniphilus anaerobius*.

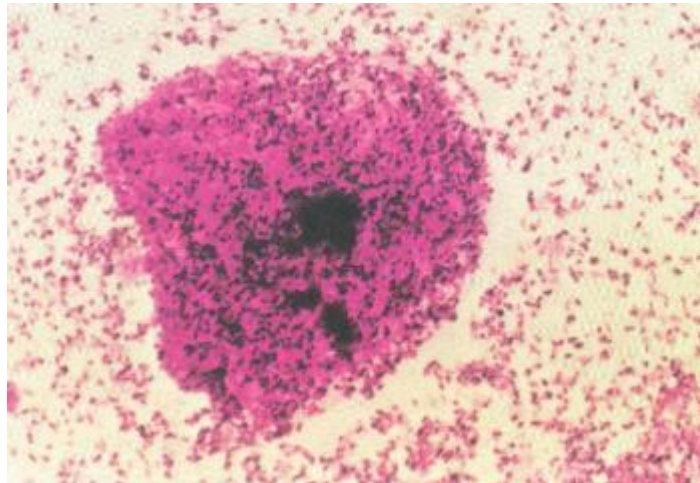
A grande heterogeneidade da VB dificulta o estabelecimento da sua fisiopatologia e composição microbiana. Esse cenário é agravado pelo fato que a maioria das espécies presentes são fastidiosas, característica que inviabiliza a realização e coloca em cheque os achados acerca dos métodos baseados em cultura microbiológica tradicional. Dessa forma, para viabilizar o diagnóstico da VB, foram estabelecidos os critérios clínicos (AMSEL et al., 1983) e microscópicos baseados na semiquantificação e proporção entre os morfotipos existentes no conteúdo vaginal. Estes critérios microscópicos descritos incluem de Spiegel e colaboradores (1983), Platz-Christensen e colaboradores (1989), Nugent e colaboradores (1991), Thomason e colaboradores (1992), Schmidt & Hansen (2000), Ison & Hay (2002) e Donders e colaboradores (2002). Todas estas classificações têm um mesmo propósito, que consiste na padronização de um método de análise de esfregaços que abranja todos os morfotipos bacterianos em uma única classificação. É importante ressaltar que quando a grande maioria dos métodos de classificação foi descrita a microbiota vaginal ainda era denominada "flora" vaginal, denominação esta que hoje foi completamente substituída pelo termo "microbiota".

4.3 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

A técnica de avaliação dos esfregaços segundo Spiegel e colaboradores (1983) compreende a divisão da microbiota vaginal em duas classes possíveis. Segundo estes autores, a microbiota pode ser classificada como normal, quando na presença de

lactobacilos, ou como VB na ausência ou com poucos lactobacilos e predominância de *G. vaginalis* e outras bactérias. Eles usaram como base para o diagnóstico, o critério de Amsel e colaboradores (1983) no qual são avaliados: pH vaginal maior que 4,5, aumento do conteúdo vaginal, mau odor após adição de 10% de KOH e a presença de *clue cells* pela microscopia (FIGURA 1). As *clue cells* são células escamosas superficiais com uma peculiar aparência granular causada pelo acúmulo de grandes quantidades de bactérias na sua superfície (PLATZ-CHRISTENSEN et al., 1989). Sendo assim, de acordo com a técnica de Spiegel e colaboradores, o diagnóstico era positivo para BV quando pelo menos três destas quatro características são detectadas. Sendo que, os esfregaços com duas ou menos características são considerados normais, desde que leveduras ou morfotipos de *Trichomonas vaginalis* estejam ausentes.

FIGURA 1: *Clue cell* em esfregaço de parede vaginal corado pela técnica de Gram.



FONTE: SPIEGEL et al. (1983)

Para essa avaliação microscópica os esfregaços vaginais são corados pela técnica de Gram com modificação de Kopeloff, recomendada para melhor visualização de bactérias anaeróbias (LIBMAN et al., 2006), e observadas sob objetiva de imersão. Cada morfotipo bacteriano observado é quantificado conforme os escores descritos na TABELA 1. Tais autores consideram os bacilos longos Gram-positivos observados como células lactobacilares, já os bacilos curtos Gram-variáveis como *Gardnerella* e outros micro-organismos classificados apenas pela morfologia. Os esfregaços

classificados como normais apresentam apenas lactobacilos ou quando coexistem com a *Gardnerella*. Já os casos de VB são aqueles com a presença de *Gardnerella* e outros morfotipos bacterianos que não compatíveis com lactobacilos.

TABELA 1: QUANTIFICAÇÃO DE MORFOTIPOS MICROBIANOS SEGUNDO SPIEGEL et al. (1983)

Escores	Quantidade/campo
1+	< 1
2+	1 a 5
3+	6 a 30
4+	> 30

FONTE: Adaptado de SPIEGEL et al. (1983)

Esse método foi amplamente utilizado até 1991, quando Nugent e colaboradores sugeriram um novo método de classificação de microbiota que hoje é considerado o padrão ouro para diagnóstico da VB. O sistema de Nugent prevê a classificação da microbiota em três categorias com base semiquantificação dos morfotipos bacterianos e seus respectivos padrões de coloração.

Após obtenção do conteúdo vaginal, fixados em lâminas e coradas pela técnica de Gram, os esfregaços são observados em objetiva de imersão (x1000). Os bacilos longos Gram-positivos (lactobacilos), bacilos curtos Gram-variáveis (*G. vaginalis*), bacilos curtos Gram-negativos (*Bacteroides spp.*), bacilos curvos Gram-variáveis (*Mobiluncus spp.*) e cocos Gram-positivos são semiquantificados de 1+ a 4+ de acordo com o sistema descrito na TABELA 2. Posteriormente, há a atribuição de um escore somatório, conforme a TABELA 3 para classificação nas três categorias previstas: normal (escores entre 0 e 3), intermediária (escores entre 4 e 6) e VB (escores entre 7 a 10) (FIGURA 2).

TABELA 2: QUANTIFICAÇÃO DE MORFOTIPOS MICROBIANOS SEGUNDO NUGENT et al. (1991)

Quantificação	Morfotipos/campo
0	0
1+	< 1
2+	1 a 4
3+	5 a 30
4+	> 30

FONTE: Adaptado de NUGENT et al. (1991)

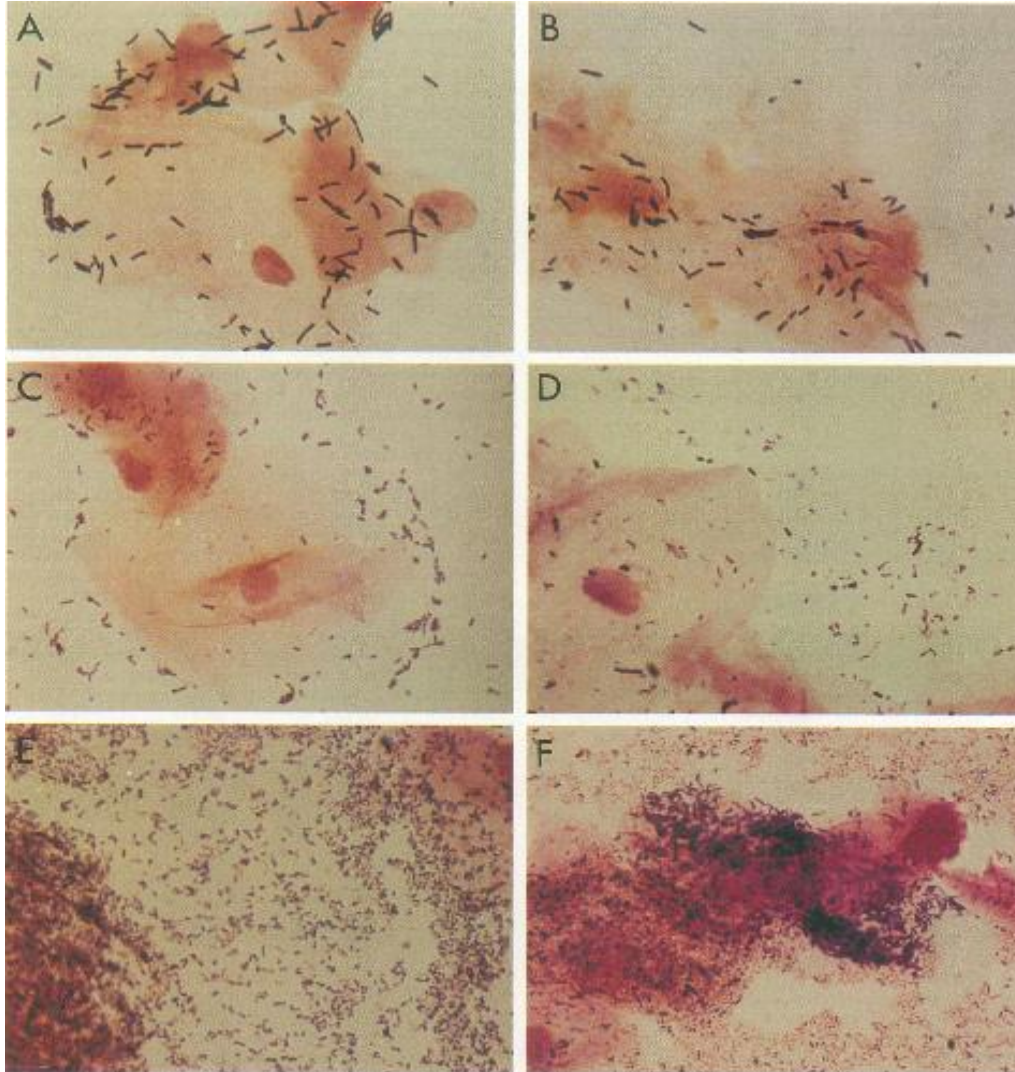
TABELA 3: SISTEMA DE ESCORES (0 a 10) DOS ESFREGAÇOS VAGINAIS CORADOS POR GRAM SEGUNDO NUGENT et al. (1991)

Score	Presença de lactobacilos	Presença de <i>Gardnerella</i> e <i>Bacteroides</i> sp.	Bacilos curvos Gram-variáveis
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ ou 2+
2	2+	2+	3+ ou 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

Os morfotipos são quantificados de acordo com o número médio por campo de imersão de óleo.
 Escore total = lactobacilos + *G. vaginalis* e *Bacteroides* sp. + bacilos curvos.

FONTE: Adaptado de NUGENT et al. (1991)

FIGURA 2: Padrões de microbiota vaginal em esfregaços corados por Gram observados sob objetiva de imersão (x1000).



A e B: microbiota normal (escores de 0 a 3); C e D: microbiota intermediária (escores de 4 a 6); E e F: vaginose bacteriana (escores de 7 a 10)

FONTE: NUGENT et al. (1991)

Os resultados do estudo de Nugent et al. (1991) indicam que esse critério de classificação proposto é altamente reprodutível entre diferentes centros. Entretanto, novas classificações da microbiota vaginal foram propostas propondo otimizá-la.

Umas delas foi proposta por Thomason e colaboradores (1992), e combina a detecção de *clue cells* com os morfotipos bacterianos encontrados no esfregaço. Por esse método, as lâminas de esfregaços vaginais também são coradas por Gram e observadas sob objetiva de imersão. Este método, entretanto, não prevê a quantificação dos morfotipos bacterianos encontrados. Dessa forma, cada campo é avaliado quanto à proporção de lactobacilos em relação a outros morfotipos. Além disso, deve-se observar se há a presença de *clue cells*. As mulheres cujos esfregaços apresentam morfotipos bacterianos excedentes aos lactobacilose e um mínimo de 20 campos com *clue cells* são diagnosticadas com VB. Os autores consideram um método de diagnóstico mais simples do que os propostos por Spiegel e colaboradores (1983) e Nugent e colaboradores (1991), visto que não despende grande quantidade de tempo para quantificar cada morfotipo bacteriano encontrado, o que, segundo os autores, permite uma maior reprodutibilidade interlaboratorial.

Uma década depois, Ison & Hay (2002) propuseram um método de classificação que inclui duas outras classes à classificação anteriormente proposta por Nugent e colaboradores (1991): classe 0, indicando ausência de bactérias e classe IV, caracterizada por células epiteliais cobertas apenas por cocos Gram-positivos. Por esse método, as lâminas também devem ser coradas pela técnica de Gram e lidas sob objetiva de imersão. Os autores consideraram que a classe 0 sugere a presença de um agente antimicrobiano na vagina e que pode ser devido ao uso de géis e cremes vaginais, já os esfregaços classificados como classe IV foram encontrados em mulheres normais e que não há evidências de que estas microbiotas tenham associação com a VB ou sejam anormais.

Embora a identificação das mulheres com VB seja feita com sucesso por Nugent e colaboradores (1991) e Ison & Hay (2002), composição bacteriana e relevância clínica

dos casos classificados como microbiota intermediária permanecem desconhecidos. Tal questão se torna ainda mais relevante quando se consideram as evidências da literatura sobre as complicações obstétricas e ginecológicas relacionadas a esse padrão “intermediário” de microbiota vaginal (CAUCI et al., 2002; GUÉDOU et al., 2012, 2013). Tais métodos consideram que a microbiota vaginal intermediária nada mais é do que um estado transitório entre a microbiota normal e a VB. Dessa forma, eles não preveem a existência de outros tipos de alteração de microbiota vaginal, o que não corresponde à complexidade de microbiotas já demonstradas (RAVEL et al., 2011; DRELL et al., 2013; ROMERO et al., 2014).

Com base nesse cenário, Gilbert Donders propôs que tal condição, considerada intermediária segundo Nugent e colaboradores (1991), abriga tipos de microbiota bastante diversos, dentre as quais a vaginite aeróbia (VA). Essa condição, bem como a VB, pode ser detectada pela avaliação dos esfregaços vaginais a fresco sem a necessidade da etapa prévia de coloração. Microscopicamente a VA é caracterizada pelo aumento de leucócitos local, presença de células epiteliais da camada parabasal e espécies bacterianas predominantemente aeróbias, diferente dos achados nos casos de VB. De acordo com os autores, as bactérias mais comuns associadas à VA são *Streptococcus* grupo B, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Entretanto, assim como a VB, a VA também está associada à depleção lactobacilar parcial ou total e, consequentemente, o aumento do pH vaginal. Dessa forma, em 2002, Donders e colaboradores, descreveram uma nova classificação de microbiota vaginal que não leva em consideração apenas a de VB como padrão anormal de microbiota vaginal, mas também a VA.

Estudo posterior realizado pelo mesmo grupo demonstrou que a VA também está associada a complicações obstétricas como risco aumentado de parto prematuro, corioamnionite e funisite do feto (DONDERS et al., 2011). Dentre os sinais e sintomas desta condição podem ser observados corrimento amarelado com mau cheiro, sensação de queimação vaginal, dor ou dispareunia acompanhados por pH vaginal

superior a 6,0. Além disso, a vagina frequentemente apresenta aspecto avermelhado, edemaciada e, às vezes, com ulcerações.

Sendo assim, o diagnóstico dessa nova entidade de microbiota vaginal anormal é passível de ser realizada em esfregaços montados a fresco (*wet mount*), sem coloração, usando um microscópio de contraste de fase. A partir das variáveis observadas, é calculado um índice ("VA score") que leva em consideração a proporção de morfotipos de lactobacilos, da microbiota acessória, da presença de células parabasais e de leucócitos tóxicos (DONDEERS et al., 2002) (FIGURA 3). As amostras são classificadas de acordo com o grau de lactobacilos (LBG). A categoria considerada normal é a LBG I que apresenta predominância absoluta de lactobacilos. Já a categoria LBG II, corresponde àquelas amostras nas quais é encontrada uma menor proporção de lactobacilos e a microbiota acessória está presente de forma significativa. O grupo LBG II é subdividido em duas categorias, uma na qual ainda é observado um número significativo de lactobacilos (LBG IIa) e outra onde os lactobacilos estão presentes, porém há a predominância de outros morfotipos bacterianos (LBG IIb). Já no grau considerado anormal predominam outras bactérias, com raros ou nenhum lactobacilo presente (LBGIII).

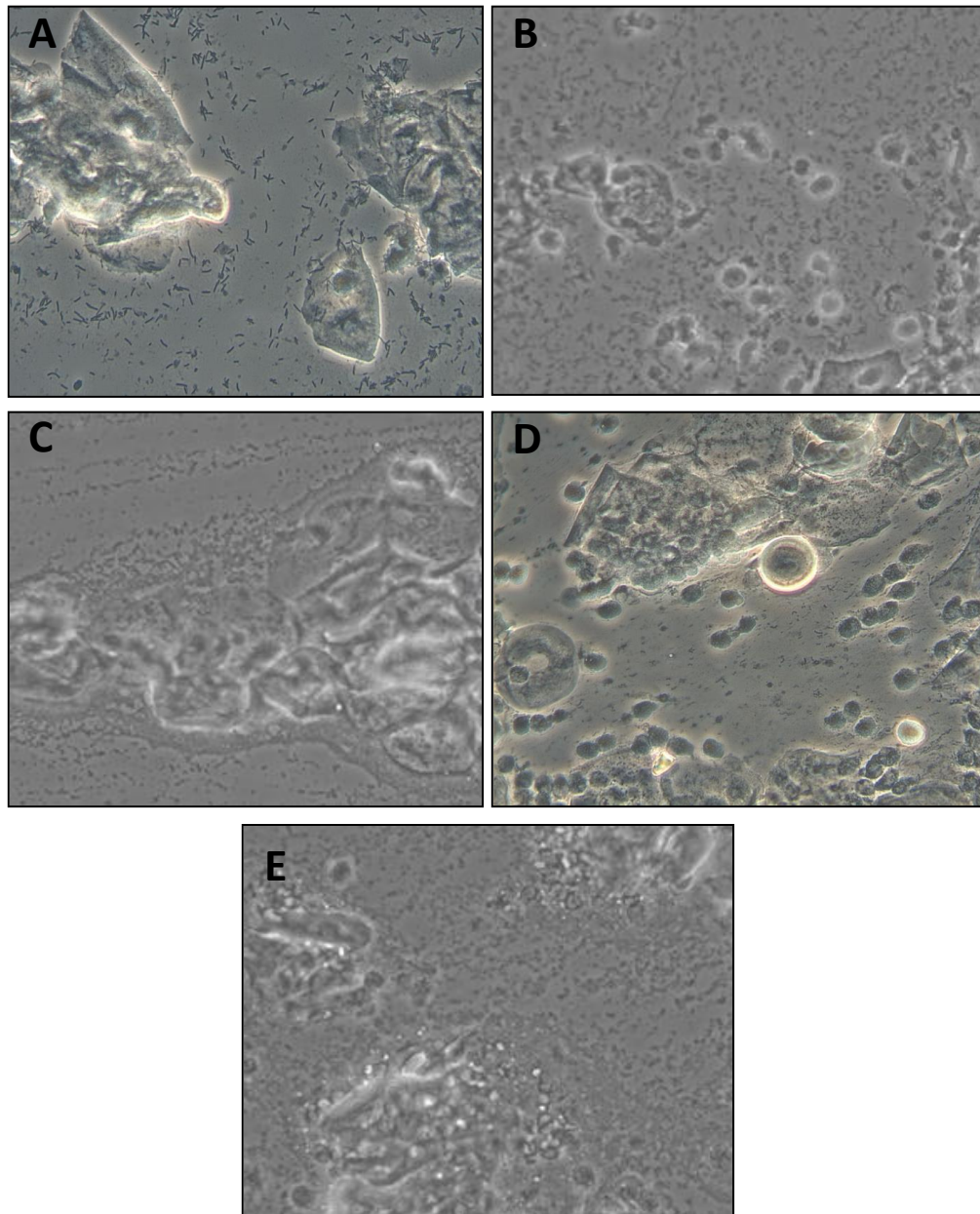
Ainda segundo esse método, a VB é diagnosticada quando há uma microbiota LBG III acompanhada por morfotipos representativos de *Gardnerella*, *Mobiluncus* de forma granular e/ou *clue cells* (FIGURA 3). Já para o diagnóstico de VA, é realizado um escore somatório, conforme o observado na Tabela 4. As amostras são consideradas como normais na presença de escores 1 e 2, como VA leve se escores 3 e 4 forem obtidos, VA moderada para escores 5 e 6 e, finalmente aquelas amostras escores entre 6 e 10 correspondem à VA severa. Esses autores também consideram que é possível que as duas alterações, VB e AV, possam coexistir no mesmo esfregaço vaginal (FIGURA 3).

TABELA 4: CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DE ESFREGAÇOS VAGINAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE VAGINITE AERÓBIA (VA).

Escore	Grau de Lactobacilos (LBG)	Número de leucócitos	Proporção de leucócitos tóxicos	Microbiota acessória	Proporção de células parabasais
0	I e IIa	≤10/campo	Nenhum ou esporádico	Não significativo ou citólise	Nenhuma ou < 1%
1	IIb	>10/campo e ≤10/cel. epitelial	≤50% dos leucócitos	Bacilos curtos	≤10%
2	III	>10/cel.epitelial	>50% dos Leucócitos	Cocos ou cadeia de cocos	> 10%

FONTE: Adaptado de DONDEERS et al (2002)

FIGURA 3: Padrões de microbiota vaginal em esfregaços montados a fresco e observados em microscópio de contraste de fase (x400).



A: Grau lactobacilar I (LBG I); B: LBG IIb; C : LBG III – vaginose bacteriana D: LBG III – vaginite aeróbia; E: LBG III vaginose bacteriana e vaginite aeróbia concomitantes.

FONTE: Laboratório de Bacteriologia Médica, Prof^a Dr^a Camila Marconi

Outras duas técnicas que também podem ser citadas são asmdescritas por Platz-Christensen (1989) e Schmidt e Hansen (2000).

Em 1989, Platz-Christensen e colaboradores propuseram uma técnica de diagnóstico de VB que se baseia unicamente na detecção de *clue cells* nos esfregaços corados pela técnica de coloração multicromática de Papanicolaou (PAPANICOLAOU, 1942). Um ano depois, em 1990, Larsson e Platz-Christensen fizeram uma descoberta importante. Eles reavaliaram após um mês as lâminas a fresco de esfregaço vaginal. Essas lâminas foram re-hidratadas para a detecção de *clue cells* e os autores constataram que as amostras apresentavam a mesma aparência que um esfregaço não preservado. Dessa forma, os autores concluíram que os esfregaços re-hidratados podem ser usados para o ensino e pesquisa clínica.

Schmidt e Hansen descreveram, em 2000, outro sistema de escores que também se baseia no método de análise de esfregaços vaginais a fresco em microscópio de contraste de fase. De acordo com esse método, são avaliadas a presença de *clue cells*, de morfotipos compatíveis com lactobacilos (LB), bacilos curtos (SB) que são considerados como os micro-organismos associados à VB, além da relação entre número de leucócitos e células epiteliais. A interpretação deve ser baseada em três campos microscópicos e a contagem deve se limitar a contagem de 30 morfotipos bacterianos.

Dessa forma, baseado no número de LB e SB são atribuídos escores conforme o detalhado na Tabela 5. Após a soma dos respectivos escores, a microbiota vaginal pode ser classificada em 4 categorias: (1) normal, caracterizada por uma predominância de morfotipos LB (pontuação 0-1); (2) intermediária grau I, caracterizada por uma predominância moderada de morfotipos LB (pontuação 2-4); (3) intermediária grau II, com predominância moderada de morfotipos SB (pontuação 5-6) e, finalmente (4) BV, caracterizada por uma predominância de morfotipos SB (pontuação 7-8) (SCHMIDT E HANSEN, 2000).

TABELA 5: SISTEMA DE ESCORE (0-8) PARA A PONTUAÇÃO DE MORFOTIPOS BACTERIANOS DOS ESFREGAÇOS A FRESCO

Escore	Morfotipos LB	Morfotipos SB
0	>30	0
1	16-30	1-5
2	6-15	6-15
3	1-5	16-30
4	0	>30

LB: lactobacilos
SB: bacilos curtos

FONTE: Adaptado de SCHMIDT E HANSEN (2000)

5 RESULTADOS E CONCLUSÕES

A descrição detalhada dos métodos microscópicos existentes para classificação da microbiota vaginal apresentada nesse estudo, permitiu uma comparação imparcial para determinar qual apresenta maiores benefícios para implantação na rotina clínica dos serviços de ginecologia e obstetrícia. As características acessadas para cada um dos métodos encontram-se descritas na Tabela 6.

Considerando a realidade dos serviços de saúde do Brasil, bem como as características da população que depende da assistência à saúde pública, o teste utilizado para a classificação da microbiota vaginal deve fornecer um resultado rápido e preciso para que a paciente deixe o local de atendimento com o tratamento adequado dispensado. Isso é mandatório considerando que as mulheres que procuram os serviços de saúde frequentemente percorrem grandes distâncias até o local do atendimento. Tal dificuldade de deslocamento é agravada pelo ônus financeiro oriundo ao tempo de afastamento das atividades remuneradas. Deve-se ressaltar ainda que, além do difícil acesso aos locais de atendimento, raros serviços de saúde estão aptos a realizar o diagnóstico das alterações de microbiota vaginal durante o período de

permanência da paciente na unidade. Mesmo diante da possibilidade de realização do diagnóstico laboratorial dessas condições, a paciente deve retornar ao serviço para obter o resultado e o eventual tratamento, nos dias ou semanas subsequentes ao atendimento. De forma geral, considerando os aspectos relacionados à disponibilidade de estratégias diagnóstica, bem como de acesso dos indivíduos aos serviços de saúde, uma grande parcela da população fica sujeita às complicações ginecológicas e obstétricas da persistência da microbiota vaginal anormal por longos períodos de tempo.

Nesse sentido, apesar de serem considerados excelentes métodos para classificação da microbiota vaginal, aqueles que necessitam de etapa de coloração prévia por Gram do esfregaço vaginal dificilmente serão considerados viáveis para a implementação nos serviços de saúde. Além de serem necessários tanto locais adequados e maior tempo para preparação dos esfregaços, esses métodos não abrangem toda a complexidade do ambiente vaginal, visto que consideram toda e qualquer alteração na microbiota vaginal como VB. Dessa maneira pode-se destacar a importância da inclusão de testes rápidos de diagnósticos nos próprios locais de atendimento.

TABELA 6: CRITÉRIOS DE COMPARAÇÃO UTILIZADOS NESSE ESTUDO QUE FORAM ACESSADOS PARA CADA UM DOS MÉTODOS MICROSCÓPICOS DE CLASSIFICAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL.

CLASSIFICAÇÕES	COLORAÇÃO	MORFOLOGIA	SEMIQUANTIFICAÇÃO DOS LACTOBACIOS	CLUE CELLS	VB	VA
Spiegel et al.	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Nugent et al.	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Thomason et al.	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não
Ison & hay et al.	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não
Donders et al.	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Platz-Christensen et al.	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não
Schmidt & Hansen	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não

VB: VAGINOSE BACTERIANA

VB: VAGINITE AERÓBIA

Pode-se concluir, portanto, que a coletânea dos métodos avaliados nesse estudo demonstra que a classificação de esfregaços vaginais a fresco é mais factível de ser implementada nos serviços de ginecologia e obstetrícia. Além disso, a heterogeneidade da composição da microbiota vaginal já demonstrada (RAVEL et al, 2011) não pode ser subestimada. Sendo assim, os sistemas de classificação que consideram as alterações de microbiota vaginal como VB unicamente não devem ser utilizadas. Considerando que a técnica proposta por Donders e colaboradores em 2002 é capaz de abranger as alterações passíveis de serem encontradas nessa microbiota. Somado a isso, pode ser aprendida em um curto espaço de tempo, conforme demonstrado por nosso grupo de pesquisa (DONDEES et al., 2015). Dessa forma, este método consiste na melhor estratégia disponível atualmente para a classificação da microbiota vaginal na rotina clínica dos serviços de ginecologia e obstetrícia.

6 REFERÊNCIAS

AMSEL R.; TOTTEN PA.; SPIEGEL CA.; CHEN KC.; ESCHENBACH D.; HOLMES KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **The American Journal of Medicine**, v. 74, n. 1, p. 14-22, 1983.

BOSKEY ER.; CONE RA.; WHALEY KJ.; MOENCH TR. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1809-1813, 2001.

BOSKEY ER.; TELSCH KM.; WHALEY KJ.; MOENCH TR.; CONE RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. **Infection and Immunity (IAI)**, v. 67, n. 10, p. 5170-5175, 1999.

BROTMAN RM.; BRADFORD LL.; CONRAD M. *et al.* Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 39, n. 10, p. 807-812, 2012.

CAUCI S.; HITTI J.; NOONAN C.; AGNEW K.; QUADRIFOGLIO F.; HILLIER SL. *et al.* Vaginal hydrolytic enzymes, immunoglobulin A against Gardnerella vaginalis toxin, and risk of early preterm birth among women in preterm labor with bacterial vaginosis or intermediate flora. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.187, n.4, p. 877-81, 2002.

CHAWLA R.; BHALLA P.; CHADHA S.; GROVER S.; GARG S. Comparison of Hay's criteria with Nugent's scoring system for Diagnosis of Bacterial Vaginosis. **BioMed Research International**, 2013.

CHERPES TL.; MEYN LA.; KROHN MA.; LURIE JG.; HILLIER SL. Association with acquisition of herpes simplex virus type 2 in women with bacterial vaginosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, n.3, p. 319-325, 2003.

CRIBBY S.; TAYLOR M.; REID G. Vaginal microbiota and the use of probiotics. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2008.

CRISWELL BS.; LUDWIG CL.; GARDNER HL. *et al.* Haemophilus vaginalis: Vaginitis by inoculation from culture. **Obstetrics & Gynecology**, v. 33, n.2, p. 195-199, 1969.

DODERLEIN A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung fur das puerperalfieber. Leipzig: Verloag von Edard Besold, 1892.

DONDERS GG.; BOSMANS E.; DEKEERSMAECKER A.; VEREECKEN A.; VAN BULCK B.; SPITZ B. Pathogenesis of abnormal vaginal bacterial flora. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 182, n. 4, p.872-878, 2000.

DONDERS GG; BELLEN, G.; REZEBERGA, D. Aerobic vaginitis in pregnancy. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v.118, n.10, p.1163–1170, 2011.

DONDERS GG. Microscopy of bacterial flora on fresh vaginal smears. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 7, n. 3, p. 126-127 1999.

DONDERS GG.; VEREECKEN A.; BOSMANS E.; DEKEERSMAECKER A.; SALEMBIER G.; SPITZ B. Definition of a type of abnormal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 109, n. 1, p. 34-43, 2002.

DONDERS GG.; VEREECKEN A.; DEKEERSMAECKER A.; VAN BULCK B.; SPITZ B. Wet mount microscopy reflects functional vaginal lactobacillary microbiota better than Gram stain. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, n. 1, p. 308-313, 2000.

DRELL T.; LILLSAAR T.; TUMMELEHT L.; SIMM J.; AASPÖLLU A.; VÄIN E. *et al.* Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. **PLoS One**, v. 8, n.1, p. E54379, 2013.

ESCHENBACH DA.; DAVICK PR.; WILLIAMS BL. *et al.* Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n.2, p. 251-256, 1989.

ESCHENBACH DA.; GRAETT MG.; CHEN KC.; HOYME UB.; HOLMES KK. Bacterial vaginosis during pregnancy. An association with prematurity and postpartum complications. **Scandinavian journal of urology and nephrology**, v.86, p. 213-222, 1984.

FREDRICSSON B.; HAGSTRÖM B.; EVALDSON G.; NORD CE. Gardnerella-Associated Vaginitis and Anaerobic Bacteria. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 17, n. 5, p. 236-241, 1984.

GARDNER HL.; DUKES CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified 'non specific vaginitis'. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 69, n. 5, p. 962-976, 1955.

GOLDENBERG RL.; HAUTH JC.; ANDREWS WW. Intrauterine infection and preterm delivery. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 20, p. 1500-1507, 2000.

GREENWOOD JR.; PICKETT MJ. Transfer of *Haemophilus vaginalis* to a new genus, Gardnerella: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. **Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, n. 1, p. 170-178, 1980.

GUASCHINO S.; DE SANTO D.; DE SETA F. New perspectives in antibiotic prophylaxis of obstetric and gynecology surgery. **The Journal of Hospital Infection**, v. 50 (Suppl 1), p. S13-S16, 2002.

GUÉDOU FA.; DAMME LV.; MIREMBE F.; SOLOMON S.; BECKER M.; DEESE J. *et al.* Intermediate vaginal flora is associated with HIV prevalence as strongly as bacterial vaginosis in a cross-sectional study of participants screened for a randomized controlled trial. **Sexually Transmitted Infections**, v. 88, n. 7, p. 545-551, 2012.

GUÉDOU FA.; VAN DAMME L.; DEESE J.; CRUCITTI T.; MIREMBE F.; SOLOMON S. *et al.* Intermediate vaginal flora and bacterial vaginosis are associated with the same factors: findings from an exploratory analysis among female sex workers in Africa and India. **Sexually Transmitted Infections**, v. 90, n. 2, p.161-164, 2013

HILLIER SL.; KROHN MA.; RABE LK.; KLEBANOFF SJ.; ESCHENBACH DA. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16 (Suppl 4), p. S273–S281, 1993.

HOLST E.; GOFFENG AR.; ANDERSCH B. Bacterial vaginosis and vaginal microorganisms in idiopathic premature labor and association with pregnancy outcome 1972. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 176-186, 1994.

ISON CA.; HAY PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. **Sexually Transmitted Infections**, v. 78, n. 6, p. 413-415, 2002.

KOUMANS EH.; STERNBERG M.; BRUCE C. *et al.* The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 34, n. 11, p. 864-869, 2007.

KOVACHEV SM. Obstetric and Gynecological Diseases and Complications resulting from Vaginal Dysbacteriosis. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 2, p. 173-184, 2014.

LARSSON PG.; PLATZ-CHRISTENSEN, JJ. Enumeration of clue cells in rehydrated air-dried vaginal wet smears for the diagnosis of bacterial vaginosis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 76, n. 4, p. 727–730, 1990.

LEITICH H.; BODNER-ADLER B.; BRUNBAUER M.; KAIDER A.; EGARTER C.; HUSSLEIN P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 189, n. 1, p. 139-147, 2003.

LIBMAN MD.; KRAMER M.; PLATT R.; MONTREAL PREMATUREITY STUDY GROUP. Comparison of Gram and Kopeloff stains in the diagnosis of bacterial vaginosis in pregnancy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 54, n.3, p. 197–201, 2006.

MARCONI C.; DUARTE MT.; SILVA DC.; SILVA MG. Prevalence of and risk factors for bacterial vaginosis among women of reproductive age attending cervical screening in

southeastern Brazil. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 131, n. 2, p. 137-141, 2015.

DONDERS G.; MARCONI C.; BELLEN G.; DONDERS F.; MICHIELS T. Effect of short training on vaginal fluid microscopy (wet mount) learning. **Journal of Lower Genital Tract Diseases**. V. 19, n. 2, p. 165-169, 2015.

MARTIN HL.; RICHARDSON BA.; NYANGE PM. *et al.* Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 6, p. 1863-1868, 1999.

MCDONALD HM.; O'LOUGHLIN JA.; JOLLEY P.; VIGNESWARAN R.; MC DONALD PJ. Prenatal microbiological risk factors associated with preterm birth. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 99, n. 3, p. 190-196, 1992.

MCLEAN NW.; ROSENSTEIN IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 543-552, 2000.

NUGENT RP.; KROHN MA.; HILLIER SL. Reliability of Diagnosing Bacterial Vaginosis is Improved by a Standardized Method of Gram stain Interpretation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 297-301, 1991.

PAPANICOLAOU GN. A new procedure for staining vaginal smears. **Science**, v. 95, n.2469 ,p.438-439, 1942.

PAVLOVA SI.; KILIC AO.; KILIC SS. *et al.* Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 451-459, 2001.

PETROVA MI.; VAN DEN BROEK M.; BALZARINI J.; VANDERLEYDEN J.; LEBEER S. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 762-792, 2013.

PLATZ-CHRISTENSEN, JJ.; LARSSON PG.; SUNDSTROM E.; BONDESON L. Detection of bacterial vaginosis in Papanicolaou smears. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 160, n. 1, p. 132-133, 1989.

PLATZ-CHRISTENSEN JJ.; PERNEVI P.; HAGMAR B.; ANDERSSON E.; BRANDBERG A.; WIQVIST N. A longitudinal follow-up of bacterial vaginosis during pregnancy. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 72, n. 2, p. 99-102, 1993.

RAVEL J.; GAJER P.; ABDO Z.; SCHNEIDER GM.; KOENIG SS.; MCCULLE SL. *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108 (Suppl 1), p. 4680-4687, 2011.

ROMERO R.; HASSAN SS.; GAJER P.; TARCA AL.; FADROSH DW.; NIKITA L. *et al.* The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. **Microbiome**, v. 2, n. 10, 2014.

SCHMIDT H.; HANSEN JG. Diagnosis of bacterial vaginosis by wet mount identification of bacterial morphotypes in vaginal fluid. **International Journal of STD & AIDS**, v. 11, n. 3, p. 150–155, 2000.

SEWANKAMBO N.; GRAY RH.; WAWER MJ. *et al.* HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. **The Lancet**, v. 350, n. 9077, p.546-550, 1997.

SCHWEBKE JR.; FLYNN MS.; RIVERS CA. Prevalence of *Gardnerella vaginalis* among women with lactobacillus-predominant vaginal flora. **Sexually Transmitted Infections**, v. 90, n. 1, p. 61-63, 2013.

SCHWEBKE JR. Role of vaginal flora as a barrier to HIV acquisition. **Current Infectious Disease Reports**, v. 3, n. 2, p. 152-155, 2001.

SOBEL JD. Bacterial Vaginosis – an ecologic mystery. **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 7, p. 551-553, 1989.

SONG YL.; KATO N.; MATSUMIYA Y.; LIU CX.; KATO H.; WATANABE K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 3062-3064, 1999.

SPIEGEL CA.; AMSEL R.; ESCHENBACH D.; SCHOENKNECHT F.; HOLMES KK. Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. **The New England Journal of Medicine**, v. 303, n. 11, p. 601-607, 1980.

SPIEGEL CA.; AMSEL R.; HOLMES KK. Diagnosis of Bacterial Vaginosis by Direct Gram Stain of Vaginal Fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 170-177, 1983.

SRINIVASAN S.; LIU C.; MITCHELL CM.; FIEDLER TL.; THOMAS KK. *et al.* Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. E10197, 2010.

SWEET RL. Gynecologic conditions and bacterial vaginosis implications for the non-pregnant patient. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 8, n. 3-4, p. 184-190, 2000.

THOMASON JL.; ANDERSON RJ.; GELBART SM.; OSYPOWSKI PJ.; SCAGLIONE NJ.; EL TABBAKH G. *et al.* Simplified Gram stain interpretative method for diagnosis of bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 167, n.1, p. 16-19, 1992.

WIESENFELD HC.; HILLIER SL.; KROHN MA.; LANDERS DV.; SWEET RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 5, p. 663-668, 2003.

WIGGINS R.; HICKS SJ.; SOOTHILL PW.; MILLAR MR.; CORFIELD AP. Mucins and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. **Sexually Transmitted Infections**, v. 77, n. 6, p. 402-408, 2001.

XARRIFARD MR.; SAIFFUDIN M.; SHA BE.; SPEAR GT. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real time PCR for Lactobacilli, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 277-281, 2002.